

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM  
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO FokI DO GENE RECEPTOR DE VITAMINA  
D(VDR) EM PACIENTES BRASILEIROS INFECTADOS PELO HCV EM  
DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA**

KELLY KATHERYNE OSÓRIO KERCHER

PORTO ALEGRE

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM

GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO FokI DO GENE RECEPTOR DE VITAMINA D  
(VDR) EM PACIENTES BRASILEIROS INFECTADOS PELO HCV EM  
DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA**

KELLY KATHERYNE OSÓRIO KERCHER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientador: Dr. José Artur Bogo Chies

PORTO ALEGRE

2021

#### CIP - Catalogação na Publicação

Osório Kercher, Kelly Katheryne  
ESTUDO DO POLIMORFISMO FokI DO GENE RECEPTOR DE  
VITAMINA D(VDR) EM PACIENTES BRASILEIROS INFECTADOS  
PELO HCV EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA / Kelly  
Katheryne Osório Kercher. -- 2021.

87 f.

Orientador: José Artur Bogo Chies.

Coorientadora: Natália Schneider Nunes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e  
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Hepatite C. 2. Polimorfismo genético. 3. FokI.  
4. VDR. 5. Vitamina D. I. Bogo Chies, José Artur,  
orient. II. Schneider Nunes, Natália, coorient. III.  
Título.

## AGRADECIMENTOS

Deus, obrigada pelas coincidências e oportunidades que o verbo viver proporciona. Pelas pessoas que compuseram a trajetória e até aqui, principalmente as listadas abaixo. Grata pelas portas que foram fechadas e pela minha curiosidade incessante de desbravar as portas entreabertas. Obrigada pelos dias ruins, que fizeram dos dias bons, os melhores. Obrigada pela evolução humana, profissional e espiritual. Pelos verbos que conjuguei até aqui e daqui em diante.

Obrigada Mamãe e Papai, por me ensinarem sobre valores, trabalho e coragem.

Vó, obrigada por ter formado uma estrutura tão forte em mim. É difícil escrever sobre câncer e não poder estar te ajudando ativamente a enfrentar esse mesmo problema. Sei que muito orgulho já te dei em justificativa da minha ausência. Espero que estejas aqui comigo sempre.

Obrigada Tâninha por ser o ser humano que és e por me dar o suporte nos cuidados em casa, tanto a física quanto a emocional. Tinha escrito essas duas linhas antes de você partir para nos cuidar de outro plano espiritual. Minha gratidão será indelével por tudo que fizestes por nós.

Obrigada Patrick, pelo apoio nos momentos mais difíceis. Obrigada por me ensinar valores importantes ao longo desta formação do eu. És uma pessoa admirável, fico feliz por compartilhar contigo minha história.

Obrigada as minhas fiéis amigas, pelos conselhos e momentos de diversão. Vocês formaram uma base muito estruturada na minha vida.

Amanda, Bruno, Elisa e Nati, vocês são o melhor time. Espero que essa conexão nunca se perca, não nos encontramos por acaso.

Por fim, e não menos importante, obrigada professor José, por ter aceitado esse desafio de orientar e aconselhar. Tenho imensa gratidão pela paciência e pela oportunidade de me permitir vivenciar o âmbito da genética. Não posso deixar de dedicar meu agradecimento também ao Joel, colega que me ajudou muito a entender sobre biologia molecular e sanar minhas dúvidas.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Hepatite C .....	16
2.1.1 Transmissão.....	17
2.1.2 Fase aguda e crônica da infecção por HCV .....	17
2.1.3 Progressão .....	19
2.1.4 Diagnóstico.....	21
2.1.5 Tratamento .....	23
2.2 Suscetibilidade genética – Infecção e Progressão .....	25
2.2.1 O que são polimorfismos.....	27
2.3 Vitamina D.....	29
2.3.1 Metabolismo da Vitamina D.....	32
2.3.2 Vitamina D e Fígado.....	34
2.3.3 Estudos com o uso da Vitamina D no HCV .....	36
2.3.4 Receptor de Vitamina D (VDR) .....	38
2.3.5 Gene VDR e HCV .....	40
2.3.6 VDR na fibrose hepática.....	43

2.3.7 VDR no hepatocarcinoma .....	45
2.3.8 Polimorfismo foki e HCV.....	45
3. JUSTIFICATIVA.....	49
4. QUESTÃO DA PESQUISA .....	50
5. HIPÓTESE.....	51
6. OBJETIVOS.....	52
6.1 OBJETIVO GERAL .....	52
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
7. ARTIGO EM INGLÊS.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
8. CONCLUSÕES.....	53
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
10. REFERÊNCIAS .....	55

## RESUMO

A hepatite C é uma das principais doenças hepáticas relacionadas a desfechos negativos a longo prazo. Sua progressão pode envolver fibrose, cirrose e hepatocarcinoma, o que conferiu um aumento na mortalidade brasileira nos últimos anos. Sabe-se que existe um potencial de resposta imune do hospedeiro capaz de reduzir sua cronicidade ou favorecer desfechos menos lesivos. A vitamina D efetivamente ativa está relacionada a processos imunomediados. Polimorfismos no gene que codifica o receptor de vitamina D (VDR) podem conferir proteção na suscetibilidade à infecção pelo HCV assim como exercer influência na progressão dos desfechos hepáticos tais como a fibrose hepática.

O objetivo deste estudo foi investigar a associação potencial da variante genética FokI do gene VDR em pacientes HCV positivos (HCV+) com diferentes perfis clínicos. Foram avaliadas 222 amostras de indivíduos de Porto Alegre HCV+ coletadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As amostras foram genotipadas através da técnica de Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) precedida por amplificação por PCR com primers específicos. As frequências genotípicas foram testadas para Equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste do chi-quadrado. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas com dados de um grupo controle (n=191) obtido de um trabalho realizado e já publicado por Borborema et al, 2020. Para as comparações entre grupos, foi utilizado o teste do chi-quadrado com correção de Yates ou o teste exato de Fisher. O valor de  $p < 0,05$  foi estabelecido como estatisticamente significativo. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética das instituições envolvidas na coleta da amostra e todos os participantes

assinaram o termo de consentimento. As frequências genóticas estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Considerando as comparações de genótipos entre os grupos, o grupo de indivíduos HCV<sup>+</sup> (sem considerar estratificação por perfil clínico;  $n=222$ ) e o subgrupo de indivíduos HCV<sup>+</sup> com fibrose ( $n=35$ ) diferiram estatisticamente do grupo controle, com valores de  $p=0.031$  e  $p=0.032$ , respectivamente. O genótipo CC foi associado com proteção contra infecção pelo HCV e menor risco de desenvolvimento de fibrose. O genótipo CT foi associado com maior risco de infecção pelo HCV e maior risco de desenvolvimento de fibrose. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas demais comparações entre grupos envolvendo genótipos. Os resultados sugerem um efeito protetivo do alelo C em relação à infecção pelo HCV e desenvolvimento de fibrose (principalmente na presença do genótipo CC).

**Palavras-chave:** HCV, VDR, polimorfismo, FokI.



## ABSTRACT

**Background:** Hepatitis C (HCV) is one of the main liver diseases related to long-term negative outcomes. Its progression can include fibrosis, cirrhosis and hepatocarcinoma, and such conditions have recently been associated with increased mortality amongst Brazilians. However, host genetic factors and immune responses are potentially associated to prevention of chronicity, thus favoring better outcomes. Active vitamin D is related to immunomodulatory processes, and genetic polymorphisms in its receptor gene (*VDR*) may provide protection to HCV infection susceptibility, as well as can influence the progression and outcomes of liver disease. The aim of this study was to investigate the association of the FokI genetic variant of the *VDR* gene in HCV positive patients (HCV<sup>+</sup>) with different clinical profiles.

**Methods and results:** 222 samples from HCV<sup>+</sup> individuals collected at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) were evaluated. The samples were genotyped using the Restriction Fragment Size Polymorphism (RFLP) technique. Genotypic frequencies were tested for Hardy-Weinberg equilibrium using the chi-square test. The allele and genotype frequencies were compared to a control group (n = 191) obtained from the literature. The HCV<sup>+</sup> group (n = 222) and the subgroup of HCV<sup>+</sup> individuals with fibrosis (n = 35) differed statistically from the control group ( $p = 0.031$  and  $p = 0.032$ , respectively). The CC genotype was associated with protection against HCV infection and decreased risk of developing fibrosis, being increased in the control group

(57.59%) when compared to individuals infected by HCV (HCV<sup>+</sup> 45.95% and HCV<sup>+</sup>/ fibrosis: 37.14%). The CT genotype was associated with a higher risk of HCV infection and fibrosis, as showed by higher levels in HCV infected individuals (HCV<sup>+</sup> 43.24% and HCV<sup>+</sup> / fibrosis: 54.29%) when compared to the Control group (30.89%).

**Conclusions:** The results suggest a potential protective effect of the C allele regarding HCV infection and fibrosis (mainly in the presence of the CC genotype).

**Key words:** HCV, VDR, polymorphism, Fok1.

## LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)<sub>2</sub>D – 1,25-dihidroxivitamina D

25(OH)D – 25-hidroxivitamina D

3'UTR – 3' untranslated region (região 3' não traduzida)

AADS – antivirais de ação direta (*direct acting antivirals*)

ALT – alanina aminotransferase

APCs- células apresentadoras de antígenos

AST –aspartato aminotransferase

bAt (haplótipo dos alelos BsmI, ApaI e TaqI)

CEHs – células hepáticas estreladas

CYP27A1 – enzima mitocondrial

CYP27B1 – enzima 1- $\alpha$ -hidroxilase

CYP2R1 - (Cytochrome P450 Family 2 Subfamily R Member 1)

DBP – proteína ligadora de vitamina D

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EB1089 – análogo de vitamina D seocalcitol

FTO – *fat mass and obesity associated protein* (proteína da obesidade e de massa de gordura associada)

HCC – Hepatocarcinoma

HCV – Hepatite C crônica

HIV – virus da imunodeficiência humana

HVB – Hepatite B crônica

IFN - interferon

KDa – quilodalton

LCA - ácido litocólico

MELD - *Model for End-Stage Liver Disease*

NAFLD - Non-alcoholic fatty liver disease (doença hepática gordurosa não alcoólica)

ng/ml – nanograma por mililitro

NK – células natural killer

nmol/l – nanomol por litro

OR – odds ratio (razão de chances)

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PEG-IFN – interferon peguilado

PTH - paratormônio

RBV - ribavirina

RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RVS – Resposta virológica sustentada

RXR – *retinoid X receptor* (receptor X retinóico)

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de nucleotídeo único)

Th – *T helper* (T auxiliar)

TNF- $\alpha$  – *tumor necrosis fator alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

VDR – *vitamin D receptor* (receptor de vitamina D)

VDRE – *Vitamin D response element* (elementos de resposta a vitamina D)

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### ARTIGO

Table 1. Demographic and clinical data of the HCV+ individuals as a single group and stratified according to clinical criteria.....57

Table 2. VDR FokI C/T (rs2228570) genotypic and allelic frequencies.....60

Table 3. Comparisons between the groups considering the genotypic frequencies.....61

Table 4. Comparisons between the groups considering the allelic frequencies.....62

## 1. INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença infecciosa ocasionada pelo vírus da hepatite C (*hepatitis C virus*), que se configura como um vírus RNA da família *Flaviviridae*. Após a infecção, podem ocorrer eventos de resposta imunológica de caráter inflamatório relacionados a piores desfechos hepáticos a longo prazo, sendo a infecção pelo HCV a principal causa de óbito entre as doenças do fígado (1).

As fases aguda e crônica da doença não ocasionam sintomas significativos na maioria dos casos. A resolução espontânea do vírus ocorre em 15% a 45% dos casos na fase aguda(1). Porém, quando desencadeia cronicidade em 55% a 85% dos casos, sua progressão pode evoluir para fibrose hepática, 20 a 30% dos indivíduos podendo avançar para cirrose e até 4% destes podem desenvolver a carcinoma hepatocelular (HCC) (1).

Sabe-se que existe um potencial de resposta imune do hospedeiro capaz de diminuir a suscetibilidade à infecção, bem como reduzir sua cronicidade ou favorecer desfechos menos lesivos. Entre os fatores que podem afetar susceptibilidade, cronicidade e desfechos da infecção por HCV destacam-se os fatores genéticos, estilo de vida e saúde imunológica (2).

A vitamina D se torna efetivamente ativa quando ligada ao seu receptor VDR (receptor de vitamina D), e está relacionada a processos imunomediados envolvidos na suscetibilidade ou resistência à progressão de diversas doenças, incluindo a hepatite C crônica (HCV). Os efeitos imunomoduladores da vitamina D estimulam a ativação de monócitos, suprimem a proliferação de linfócitos e a produção de imunoglobulinas e citocinas. O gene que codifica a proteína VDR,

chamado de gene *VDR*, está localizado no cromossomo 12q13.11 em humanos e diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) já foram descritos para este gene. Uma importante variante descrita para o gene *VDR* é FokI (C > T), na qual uma mutação missense no local de iniciação da tradução leva a uma modificação no comprimento e na atividade funcional da proteína *VDR* (3), afetando a atividade do *VDR* e, subsequentemente, comprometendo os efeitos da vitamina D no organismo.

Diversos estudos recentemente publicados sugeriram que o genótipo homozigoto para o alelo C do polimorfismo FokI *VDR* pode conferir proteção e/ou favorecer um melhor desfecho para algumas doenças hepáticas como, hepatite B (HVB), carcinoma hepatocelular (HCC) e Hepatite autoimune (4–6). Estes mesmos estudos relacionaram a presença do alelo T com desfechos negativos nas situações anteriormente citadas (4–6), porém, ainda há controvérsias relacionando este polimorfismo à infecção pelo HCV.

Desta forma, este estudo teve como objetivo associar as variantes alélicas do polimorfismo FokI *VDR* e suscetibilidade à infecção pelo HCV, além de avaliar o papel destas variantes no desfecho da infecção. Para tanto, pacientes HCV positivos foram avaliados considerando-se desenvolvimento de fibrose, cirrose e HCC.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Hepatite C

A hepatite C é uma doença hepática de caráter inflamatório ocasionada pelo Vírus da Hepatite C (*hepatitis C virus*, HCV). Esta doença apresenta uma elevada taxa de cronicidade, podendo evoluir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, as quais são classificadas como as principais causas de transplante de fígado no Brasil(7,8). Estima-se que 3% da população mundial esteja infectada pelo HCV, ou seja, que 183 milhões de pessoas no mundo tenham hepatite C(1,2,9). O Brasil possui endemicidade intermediária, com prevalência de 2,5 a 10% em diferentes regiões socioeconômicas. Entre os anos de 1999 a 2019 foram notificados 253.307 casos de hepatite C em brasileiros. Na análise da distribuição dos casos de HCV notificados por regiões no Brasil em 2019, 57,7% destes ocorreram no Sudeste, 26,7% no Sul, 8,6% no Nordeste, 3,7% no Centro-Oeste e 3,3% na região Norte (7). Segundo o Ministério da Saúde, os óbitos por HCV+ são a maior causa de morte entre as hepatites virais, uma vez que, entre os 74.864 óbitos por hepatites virais notificados de 2000 a 2018, 57.023 (76,02%) corresponderam à hepatite C (7). Quando analisada a distribuição proporcional do total de óbitos por HCV como causa básica entre as regiões brasileiras, verifica-se que 56,2% foram registrados no Sudeste, 23,7% no Sul, 10,8% no Nordeste, 4,9% no Norte e 4,4% no Centro-Oeste (7). A ampla variabilidade genética do HCV, associada à sua capacidade de evasão da resposta imune, tem dificultado o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Além disso, existem limitações das estratégias para prevenção e acesso ao tratamento medicamentoso pós diagnóstico (10).

### **2.1.1 Transmissão**

A transmissão do vírus ocorre a partir da exposição percutânea ao sangue, hemoderivados contaminados, ou em relações sexuais desprotegidas. Desta forma, são fatores de risco e vulnerabilidade para contágio e infecção pelo HCV o contato de mucosas, compartilhamento de seringas e agulhas entre usuários de drogas injetáveis, exposição a material médico não esterilizado, exposição ao sangue contaminado em tratamentos de acupuntura, realização de tatuagens e piercings sem os devidos cuidados de esterilização de material, acidentes de trabalho na área da saúde com materiais perfuro cortantes, comportamentos sexuais de risco incluindo múltiplos parceiros ou intercurso sexual sem proteção (11). Também configura como possível via de contaminação a transmissão vertical de grávidas infectadas (sendo esta a causa de 3,5 a 5% dos casos) (12), e o contato domiciliar com pessoas infectadas através do compartilhamento de objetos de uso pessoal, sendo este último fator associado a um risco menor (13). Segundo o Ministério da Saúde, em 2019, a proporção de infecções por via sexual (9,2%) foi superior ao percentual de infecções relacionadas ao uso de drogas (7,1%), perfil que mudou significativamente em relação a anos anteriores (7).

### **2.1.2 Fase aguda e crônica da infecção por HCV**

Após a infecção pelo vírus, a hepatite C apresenta-se clinicamente em uma fase aguda da infecção, caracterizada pelos primeiros seis meses após o contágio, podendo posteriormente evoluir para uma fase crônica. Geralmente, ambas as fases são assintomáticas e anictéricas (14) o que dificulta o diagnóstico e a implementação de tratamento precoce.

Na fase aguda da replicação viral, o paciente pode apresentar sinais clínicos como icterícia, fadiga, náuseas e marcadores elevados de provas hepáticas como Alanina Aminotransferases (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) no soro. Em geral, estes não são sintomas graves, o que faz com que o paciente raramente busque atendimento médico para investigação, ocorrendo uma maior chance de progressão para a fase crônica (9). Apenas 20% dos casos de infecção aguda por HCV apresentam depuração espontânea do vírus, sendo estes mais prevalentes em indivíduos jovens, do sexo feminino e/ou que tiveram baixos níveis de carga viral em seu contágio (15). Em torno de 15 a 45% dos pacientes que iniciam tratamento nesta fase apresentam recuperação completa da doença (16), sendo que, uma das hipóteses para explicar uma maior chance de recuperação nesta fase incorpora a presença de fatores genéticos suscetíveis à eliminação viral, ou *clearance* (2).

Mesmo que haja possibilidade de cura da infecção na fase aguda com tratamentos específicos, a maioria dos casos de pacientes que tiveram contato com o HCV evolui para o estágio crônico (o que corresponde a 80% dos casos). Esta situação está modificando-se com a incorporação à prática clínica de novos tratamentos antivirais incluídos os antivirais de ação direta (AADs), que apresentam taxa de cura de mais de 95%. A transição da fase aguda para crônica geralmente não é acompanhada de sintomatologia específica (17). A fase crônica da doença hepática é confirmada pela persistência da replicação viral com presença de resposta imune e com detecção de RNA viral no soro ou em tecido hepático (15). O uso do termo Hepatite Crônica está justificado, arbitrariamente, sempre que uma lesão hepática necroinflamatória perdurar por mais de seis meses. Apesar de sua definição envolver um conceito

histopatológico e, portanto, necessitar de biópsia hepática para confirmação, na maioria das vezes o reconhecimento desta forma evolutiva de lesão hepatocelular pode ser feito pela análise simultânea de características clínicas e exames laboratoriais (17).

Os sintomas clínicos da hepatite crônica não são específicos e geralmente passam despercebidos. Porém, quando ocorrem, os sintomas comuns incluem fadiga, dificuldade de concentração e dor moderada no quadrante superior direito do abdômen. A doença avançada grave pode levar a icterícia, perda muscular, urina com coloração alterada, ascite, edema, encefalopatia hepática, sangramento gastrointestinal, esplenomegalia, eritema palmar e angioma (18). Além disso, os fatores de risco para a progressão à fibrose são: sexo masculino, idade maior que 40 anos no período da infecção, consumo de álcool superior a 50g/dia, co-infecção por Hepatite B (HBV) ou vírus da imunodeficiência humana (HIV), presença de esteatose hepática ou resistência insulínica (14). Por sua evolução insidiosa, sintomatologia leve associada à resistência em procura de assistência médica, o diagnóstico é frequentemente tardio, aumentando a chance de progressão e morbidades associadas à doença (10).

### **2.1.3 Progressão**

A progressão do HCV pode envolver estágios de fibrose, cirrose ou hepatocarcinoma, sendo variável em diferentes pacientes potencialmente devido a estilo de vida e fatores genéticos (12-14). Foi demonstrado que cerca de 20% dos pacientes desenvolvem cirrose hepática 20 a 30 anos após a

infecção pelo HCV, e 1 a 5% destes desenvolvem carcinoma hepatocelular (5,11,12).

Conforme anteriormente citado, os fatores que influenciam a progressão da doença estão associados a variações nas características virais, fatores ambientais, estilo de vida do indivíduo, idade no momento da infecção, sexo, presença de esteatose, sobrepeso e obesidade, coinfecção com HIV ou HBV e uma forte relação com as características genéticas do hospedeiro (19,20).

Os mecanismos de defesa decorrente da infecção pelo HCV ativam ações do sistema imunológico que incluem a resposta inata, participação de diferentes tipos de interferon (IFN) e células natural killer (NK), bem como a resposta adaptativa mediada por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas ao HCV. Entretanto, a mesma resposta imunológica direcionada à limitação viral e da progressão da doença hepática pode promover dano no fígado, favorecendo o desenvolvimento de fibrose, cirrose ou carcinoma (18,21).

O estágio de fibrose no fígado é definido pelo acúmulo de tecido conectivo gerado em resposta à lesão celular hepática crônica. Esse tecido fibroso é formado a partir da síntese excessiva de matriz extracelular ou derivado de sua degradação insuficiente (22). A evolução da fibrose constitui um processo complexo, envolvendo alteração estrutural do fígado, modificação da disposição vascular e, eventualmente, a alteração de função hepática pela tentativa de regeneração dos hepatócitos e de reparo ao dano tecidual. Quando essa alteração é histologicamente caracterizada por regeneração nodular difusa cercada por septos fibróticos, há o diagnóstico de cirrose (23).

Cerca de 20% dos pacientes infectados desenvolvem cirrose em um período de 10 a 30 anos, sendo que 1 a 5 % destes pacientes desenvolve, por ano, hepatocarcinoma (24). Em 2015 a cirrose afetava cerca de 2,8 milhões de pessoas em todo o mundo, e foi a causa de 1,3 milhões de mortes (1). A cirrose é caracterizada por lesão hepática prolongada devido ao dano oxidativo e à presença de fibrose, e está associada a uma diminuição da capacidade funcional do fígado (23).

O desenvolvimento do carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma (HCC) envolve mecanismos semelhantes ao da cirrose, decorrentes do dano oxidativo crônico, o qual favorece mutações, podendo elevar a taxa proliferativa das células, que se multiplicarão mais do que a capacidade de apoptose (23). Além disso, as proteínas 5A (NS5A) e NS3, codificadas pelo HCV, são capazes de interferir na expressão gênica do hospedeiro, promovendo diretamente o desenvolvimento de HCC. A inflamação mediada pelo sistema imune contribui indiretamente para o desenvolvimento de HCC. Impressionantemente, o HCC é a terceira causa de morte por câncer no mundo (25).

#### **2.1.4 Diagnóstico**

Para efetivar o diagnóstico de HCV são realizados testes diretos e indiretos. Entre os métodos indiretos encontram-se os testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos para o vírus. Os testes diretos podem detectar, quantificar ou caracterizar os componentes das partículas virais do HCV, como o RNA do HCV e o antígeno nuclear (17).

Quando o diagnóstico é obtido a partir da fase em que já está estabelecida a fibrose hepática, o controle da progressão da doença se torna importante para a tomada de decisão do tratamento e estimativa de progressão. A biopsia hepática é o método padrão usado para diagnóstico efetivo de fibrose, uma vez que fornece informações sobre o grau de inflamação, o qual reflete a lesão da doença hepática e a fase da fibrose a partir da quantidade de tecido fibroso (26).

No entanto, a biopsia hepática é um dos procedimentos mais invasivos, que gera quadro de dor e possui possíveis falhas no diagnóstico devido à variabilidade entre observadores e suas interpretações histopatológicas, erros de amostragem e alto custo. O risco de complicações é raro, mas caso ocorram, estas complicações podem levar a danos lesivos e até fatais (26,27).

A Elastografia Transitória com uso do aparelho *Fibroscan* é um método para avaliar a elasticidade e rigidez hepática que fornece uma visualização não invasiva, rápida e indolor da gravidade da fibrose (27). Essa avaliação é obtida a partir da velocidade de propagação de uma onda através de um tecido homogêneo proporcional à sua elasticidade, e corresponde à quantidade de fibrose no fígado (28). Quanto maior a firmeza do tecido, mais rapidamente a onda de corte se propaga (29). A rigidez hepática medida pelo *Fibroscan* está relacionada com o estágio de fibrose hepática, o qual é avaliado histologicamente em pacientes com HBV ou HCV. Este método pode ser usado para detectar com precisão a fibrose hepática inicial, fibrose avançada e cirrose (30).

Outras ferramentas de avaliação e prognóstico da doença são a escala de METAVIR (F1 – fibrose inicial, F2- Fibrose Intermediária, F3- Fibrose

avançada e F4- Cirrose) e os escores clínicos de pontuação do sistema Child-Pugh-Turcotte (31), originalmente descritos para estratificar pacientes em grupos de risco no pré-operatório de cirurgia portal descompensada. Apesar de ser um sistema confiável para o prognóstico de várias doenças hepáticas e também de já ter sido utilizada como critério para transplante, esta escala foi mais recentemente substituída pelo sistema MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*), que consiste em um sistema de pontuação sobre níveis séricos de creatinina, bilirrubinas e INR (índice internacional normalizado), quantificando a urgência do transplante hepático (8). Ambos os métodos, METAVIR e MELD, são preditivos de sobrevida de diversas doenças hepáticas e antecipam a probabilidade de complicações graves da cirrose, como sangramento por varizes e peritonite bacteriana espontânea (32).

### **2.1.5 Tratamento**

Atualmente, o tratamento da hepatite C tem como objetivo primário a supressão sustentada da replicação viral. Considera-se que a hepatite C foi efetivamente tratada quando o RNA do vírus do HCV está ausente ou indetectável em amostras de sangue após seis meses do término da terapia farmacológica, ou seja, quando se atinge a resposta virológica sustentada (SVR) (8,17). A SVR evoluiu exponencialmente com a implementação de terapias antivirais de ação direta (AADs), elevando a taxa de cura da doença a valores acima de 90% e diminuindo os ciclos de tratamento (7).

Os AADs visam sua ação em três alvos principais do vírus: a protease NS3/4A, a RNA polimerase NS5B e a proteína NS5A, que são proteínas não



estruturais que formam o complexo de RNA replicase do vírus. O tratamento tem como objetivo aumentar a expectativa de vida, minimizar a chance de progressão da doença, diminuir o risco de transmissão, impedir o desenvolvimento de HCC, e reduzir a probabilidade de dano hepático que torne necessário o transplante de fígado (33).

A terapia com medicamentos antivirais, como a combinação entre Interferon peguilado (PEG-IFN) e Ribavirina (RBV), tornou-se o tratamento padrão para a terapia de HCV em vários países, incluindo o Brasil. No entanto, dentre os desafios e limitações que ainda persistem, destaca-se a dificuldade de acesso à terapia devido ao alto custo (7). No Brasil, apenas 15% dos indivíduos são diagnosticados, e menos de 1% recebe tratamento, cenário semelhante ao que ocorre em outros países (34). Além disso, deve-se considerar a incerteza sobre o desenvolvimento de resistência viral, o diagnóstico tardio da infecção, a possível falha de tratamento para determinados pacientes e a falta de imunidade adquirida contra reinfecção. Especialmente em pacientes idosos e com doença hepática avançada pode haver maior risco de desenvolvimento de HCC mesmo após o tratamento (34). Vale ressaltar que os efeitos colaterais associados a drogas antivirais resultam em uma maior desistência na continuidade ao tratamento, o que ocorre em cerca de 20% dos pacientes (16).

Assim como outros vírus, o HCV é capaz de evadir a resposta imune do hospedeiro, o que pode ter efeito direto na progressão da infecção sendo, portanto, alvo de estudos (35). Ainda, o sistema imune do paciente infectado possui grandes chances de falhar na tentativa de eliminar o vírus, o que ocorre

em 50 a 85% dos casos (20). O HCV é capaz de resistir ao sistema imune modulando tanto a resposta imunológica inata quanto a adaptativa, por exemplo, bloqueando a produção de células T auxiliares do tipo 1 (Th1) (20).

Entre possíveis causas associadas a falhas de tratamento ou baixos índices de RVS, pode-se salientar alguns fatores intrínsecos como a idade elevada, o sexo masculino, ancestralidade Africana, a obesidade, a cirrose, presença de esteatose e resistência insulínica (19,22).

Ainda em andamento, estudos prevêm que fatores genéticos, como a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no genoma humano, bem como a compreensão de diferentes perfis de expressão de genes cuja expressão é estimulada por interferon e de diversas citocinas e quimiocinas, possam representar importantes componentes na predição de resposta ao tratamento (2,36).

## **2.2 Suscetibilidade genética – Infecção e Progressão**

Na interação entre microrganismo, hospedeiro e ambiente durante a infecção pelo HCV podem ocorrer respostas imunes mediadas pela susceptibilidade genética multifatorial e poligênica, caracterizadas pela interação de mais de um gene e fatores ambientais. Um gene é definido como uma unidade física e funcional básica da hereditariedade. A sequência de nucleotídeos contida em um gene determina a sequência de aminoácidos das proteínas que serão codificadas. Todas as células dos indivíduos contêm os mesmos genes, porém, os expressam diferentemente. Genes são considerados funcionalmente “polimórficos” quando variantes alélicas existem

estavelmente na população, ou seja, existem modificações da sequência gênica que podem estar presentes e que podem, eventualmente, interferir na atividade da proteína codificada em relação a esta sequência (37).

A suscetibilidade genética é o termo utilizado quando as características genéticas do indivíduo influenciam na vulnerabilidade do mesmo a contrair ou ter maior resistência a determinada doença. A susceptibilidade genética na manifestação genotípica do indivíduo pode ser influenciada, no entanto, por fatores externos. Por exemplo, mesmo que um indivíduo seja geneticamente extremamente susceptível a uma doença viral, o desenvolvimento desta depende da exposição ao vírus (30).

Alterações do tipo SNP (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), em genes que codificam citocinas, seja em suas regiões codantes de proteína ou em suas regiões promotoras, podem acarretar alterações na expressão gênica, na síntese e na atividade biológica destas importantes proteínas envolvidas com respostas às terapias, além de poder influenciar a intensidade e a duração das respostas imunes (2).

Embora o genótipo viral seja um dos principais determinantes da resposta ao tratamento em pacientes infectados pelo HCV, a produção de níveis insuficientes de algumas citocinas também pode contribuir para a persistência viral, influenciando tanto o curso natural da infecção como a resposta ao tratamento (27).

A infecção pelo HCV pode sofrer a interferência de diferentes mecanismos imunoregulatórios que afetem a susceptibilidade genética. Os polimorfismos em regiões não codificantes de genes do sistema imunológico e

variações genéticas em enzimas metabolizadoras de drogas, sugerem que os polimorfismos podem favorecer o desfecho da infecção, além de representarem alvos de estudos para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (27).

Pesquisas envolvendo a caracterização do genoma humano e de sua expressão na resposta imunológica a doenças infecciosas e seu desfecho têm crescido nos últimos anos, gerando dados sobre a influência das variações genéticas, e levando à identificação de polimorfismos em genes de indivíduos que diferem quanto a seu tratamento e sua chance de progressão com determinada doença (38).

### **2.2.1 O que são polimorfismos genéticos**

Polimorfismos (do grego, poli= muitas, morfos= formas) genéticos são variações na sequência da molécula de DNA, podendo ser resultantes de trocas, repetições, inserções ou deleções de uma ou mais bases nitrogenadas. Estas alterações podem estar localizadas em várias regiões do gene: região promotora, codificadora (éxons) e não codificadora (íntrons). Para ser considerado um alelo, uma dada alteração ou polimorfismo deve ter frequência em uma dada população maior que 1%, percentual este que a difere de uma mutação pontual da molécula de DNA ainda não caracterizada como polimórfica, a qual apresenta, portanto, frequência inferior a 1%. O genoma humano possui um número de genes estimado variando entre 30.000 e 35.000 e a sequência do DNA apresenta similaridade de 99,9% entre diferentes indivíduos. Esta incrivelmente pequena diferença entre os indivíduos corresponde à presença dos polimorfismos. Os polimorfismos na região promotora e codificadora têm maior probabilidade de modificar o

funcionamento do gene e, conseqüentemente, a função da proteína formada (39).

A variação mais frequente no DNA é a variante do tipo SNP (definida anteriormenoteno texto), caracterizada pela alteração de um único nucleotídeo, e que pode acontecer em qualquer região do genoma. Os SNPs podem ou não levar a alteração dos aminoácidos de uma proteína, dependendo da região gênica onde ocorrem. Em geral, estas alterações ocorrem muito menos frequentemente em regiões codificadores do que em regiões não-codificadora (37).

O alelo é uma das diversas variantes de um gene em uma determinada região cromossômica, conhecida por *locus* (do latim “lugar”). O *locus* é o local fixo num cromossomo onde está localizado determinado gene. O genótipo representa o conjunto de alelos que ocupa um determinado lócus em um indivíduo, recebendo a denominação de homozigoto quando a mesma variante ocupa o locus em questão nos dois cromossomos homólogos ou heterozigoto quando duas variantes diferentes ocupam o locus em questão nestes dois homólogos (37).

Um polimorfismo pode ter sua atividade dependente de heterozigose ou homozigose, sendo mais expressivo em casos de homozigose para alelo de risco. Vale ressaltar que um polimorfismo não é necessariamente deletério, podendo inclusive estar relacionado a um benefício para o portador do alelo variante.

Na prática, polimorfismos genéticos podem repercutir na susceptibilidade ou na resistência a determinadas situações, como é o exemplo de um

polimorfismo do gene *FTO* que foi identificado como envolvido na predisposição à obesidade (40). Sendo assim, estudos que envolvem a relação dos polimorfismos à susceptibilidade de situações de risco podem auxiliar no desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas, incluindo modificações de estilo de vida como prevenção de doenças (41). Por exemplo, estudos no âmbito da nutrigenômica e nutrigenética abordam estratégias nutricionais eficientes para silenciar genes que codificam condições de agravo a doenças, como é o caso da obesidade, sendo este, um dos fatores de risco para progressão do HCV e outras doenças crônicas. Este tipo de relação gene x doença representa mais um motivo que justifica a importância de estudos dos fatores genéticos que podem servir de base para novas terapias e estratégias de prevenção.

### **2.3 Vitamina D**

Vitaminas são micronutrientes hidro ou lipossolúveis, essenciais para saúde humana, pois desempenham importantes relações de proteção a doenças. As vitaminas são necessárias em pequenas quantidades diárias, geralmente provindas da alimentação. A vitamina D é uma molécula lipofílica complexa, com fórmula elementar  $C_{27}H_{44}O$  (42). É defendida na literatura atual como um hormônio essencial, uma vez que é sintetizada em humanos e submetida à regulação autócrina em interação com receptor nuclear. Este hormônio contribui para o crescimento e desenvolvimento humano, com funções importantes para ossos, músculos e equilíbrio mineral e cada vez mais se torna evidente sua importância na saúde imunológica. Nos últimos anos, estudos vêm afirmando o papel da vitamina D em doenças agudas e crônicas,

com seus efeitos sobre a preservação óssea, atuação imunológica, proteção a infecções, associação negativa com doenças autoimunes e relação significativa em prognósticos do câncer (42,43).

Esta vitamina pode ser encontrada minimamente em alimentos de origem vegetal (vitamina D2 ou ergocalciferol) ou, em maior biodisponibilidade, em alimentos de origem animal como peixes de mar (D3 ou colecalciferol)(44). Porém, sua melhor forma absorvível é proveniente da síntese cutânea a partir da exposição solar. Apenas 20% das necessidades de consumo diário de vitamina D dietética são supridos pela alimentação, a forma mais eficiente de manter níveis saudáveis é a exposição solar diária, o que torna frequente sua deficiência em diferentes populações, tanto devido ao ambiente e carga horária profissional que dificultam a exposição solar, quanto a região geográfica/climática de habitação, além de outros fatores (45). Assim, é de grande importância o avanço de estudos relacionando a hipovitaminose D e sua potencial associação a diversas doenças (46)

O calcitriol [1,25 (OH) 2D] é a forma ativa da vitamina D no organismo humano. É formado a partir de duas hidroxilações sucessivas da vitamina D que ocorrem no fígado (25-hidroxilação) e no rim (1-hidroxilação) (44). Tem como principal função, manter a homeostase do cálcio e do fósforo, além dos efeitos imunomoduladores, tais como a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e participação na resposta imune inata (47).

A 25-hidroxivitamina D sérica [colecalciferol ou 25(OH)D] é a principal forma circulante de vitamina D e também, a melhor maneira de avaliar os parâmetros bioquímicos desta vitamina. O nível ideal de 25(OH)D sérico foi

estabelecido em  $\geq 30$  ng / mL embora o limite para deficiência clínica tenha sido estabelecido em um nível  $<20$  ng / mL. A faixa intermediária entre 20 e 30 ng / mL é considerada insuficiência de vitamina D (hipovitaminose) e deve ser corrigida, geralmente, pelo uso de suplementos orais em conjunto a recomendação de exposição solar segura quando isso for possível na condição clínica do paciente (48,49).

Há inúmeras causas para uma deficiência de vitamina D, tais como redução da síntese cutânea (envelhecimento, estação climática, grandes queimados, hiperpigmentação), deficiência da absorção intestinal (doença de crohn, doença celíaca, doença de Whipple, fármacos para redução de colesterol, obesidade), doenças hereditárias (raquitismo) ou adquiridas (hipertireoidismo, osteomalácia, hiperparatireoidismo) (46,50). Além disso, variações genéticas envolvendo a proteína ligadora da Vitamina D e polimorfismos no gene *VDR* podem determinar uma variação na absorção de vitamina D, alterando níveis séricos (51)

Diversos estudos em modelos animais, além de estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram um papel potencial da vitamina D na manutenção do equilíbrio imunológico (44). A vitamina D atua no sistema imunológico adaptativo promovendo a diferenciação e regulação de macrófagos, linfócitos e células dendríticas e natural killers (NK), também interferindo na secreção de citocinas. A descoberta da presença do seu receptor, o VDR, em quase todas as células do sistema imunológico permitiu que diversos mecanismos fossem propostos para mapear a participação da vitamina D no sistema imune, porém esta participação ainda não está totalmente compreendida. Entre os efeitos imunomediados, destacam-se a redução na produção de interleucina 2 (IL-2),



interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), além da inibição da expressão de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 17 (IL-17) e da secreção e produção de autoanticorpos pelos linfócitos B(52).

Durante anos, os potenciais efeitos biológicos da vitamina D foram associados exclusivamente à regulação ósseo-mineral. Porém, houve um crescente estímulo à pesquisa relacionando a vitamina D a outros processos, entre eles, a ação anti-inflamatória desta vitamina sobre marcadores inflamatórios. Um estudo duplo-cego com mulheres saudáveis entre 50 e 65 anos que estavam com deficiência de vitamina D e receberam suplementação de 1.000Ui/dia identificou uma redução significativa em algumas citocinas inflamatórias como IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-17 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  (53). Este resultado corrobora a ação anti-inflamatória da vitamina quando esta encontra-se em níveis ideais no organismo humano, tendo um possível papel coadjuvante na prevenção de algumas doenças de caráter inflamatório.

### **2.3.1 Metabolismo da Vitamina D**

A vitamina D<sub>3</sub>, obtida de maneira endógena (exposição solar), é sintetizada pela foto conversão do 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D<sub>3</sub> na derme e epiderme, que é convertida em vitamina D<sub>3</sub> por isomerização térmica, após 24 horas (49). Já a vitamina D<sub>2</sub> que é encontrada em plantas e a D<sub>3</sub> dos alimentos de origem animal são incorporadas em quilomícrons, sendo absorvidas pelas microvilosidades intestinais após a ingestão, e posteriormente seguem para o fígado. O transporte de vitamina D<sub>3</sub> até o fígado é realizado

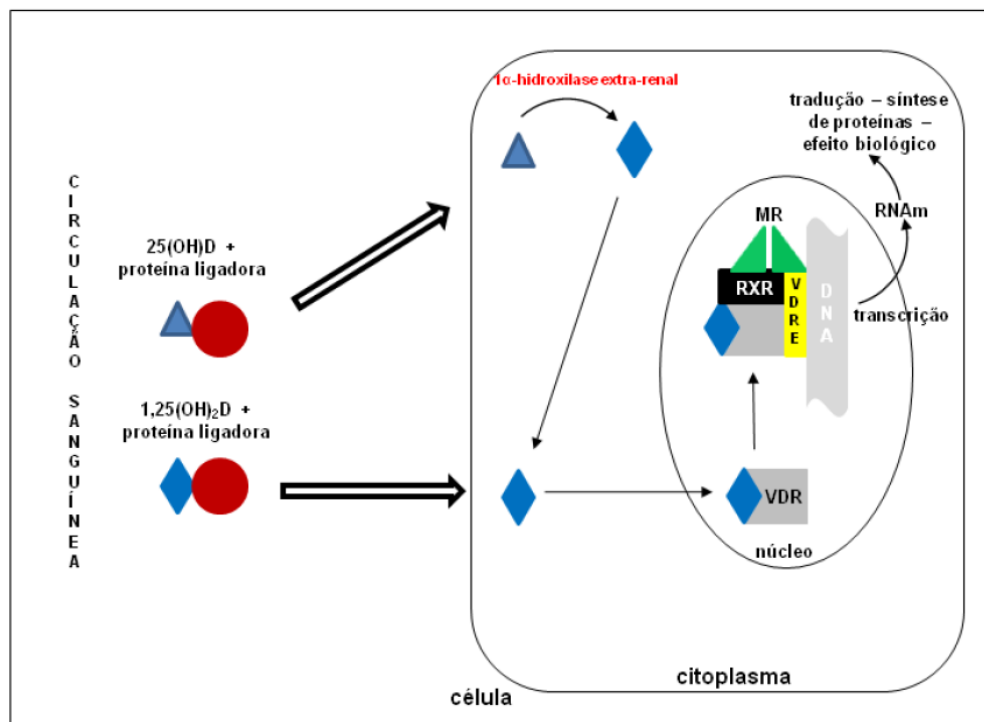
através da proteína ligante de vitamina D (DBP), também conhecida como GC-globulina (54).

A vitamina D é biologicamente inativa, então, para que possa exercer suas funções, são necessários dois processos enzimáticos que adicionam grupos hidroxilas à estrutura da molécula, resultando em seu metabólito ativo, o  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ . No fígado, ela é hidroxilada pelas enzimas do citocromo P450 27B1 (CYP) (principalmente a isoforma CYP2R1) dando origem à 25 hidroxivitamina D ( $25(\text{OH})\text{D}$ ) e secretada na circulação ligada à DBP. Este primeiro metabólito é a principal forma circulante, sendo o metabólito mensurado para avaliar o status de vitamina D na população (50).

Em seguida, a  $25(\text{OH})\text{D}$  é convertida em sua forma hormonal e verdadeiramente ativa, a  $1,25$ -dihidroxivitamina D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ] ou calcitriol, pela ação da  $1\alpha$ -hidroxilase da enzima CYP27B1 nos túbulos proximais dos rins. Este processo é regulado pelo paratormônio (PTH), que estimula a expressão e a atividade da CYP27B1 enquanto o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23) e a própria  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  desempenham efeitos inibitórios (50).

Além do fígado e rins, outros tecidos como pele e intestino expressam o citocromo P450 27B1 e podem também atuar na hidroxilação da vitamina D em sua forma ativa. A enzima hepática CYP24A1 é responsável por catabolizar o excesso de  $25(\text{OH})\text{D}$  e  $1,25(\text{OH})\text{D}$  para que sejam excretados como produtos na bile, sendo uma importante enzima para o controle dos níveis teciduais de vitamina D. É preciso destacar que tanto a vitamina D quanto seus metabólitos são transportados no sangue acoplados a glicoproteína DBP e atingem seus tecidos alvos ligando-se ao seu receptor nuclear- receptor de vitamina D (VDR), onde induzem respostas genômicas e não-genômicas. O VDR forma

um heterodímero com o receptor retinoide (RXR), se ligando a elementos responsivos a vitamina D (VDREs) no DNA, promovendo a expressão ou supressão de vários genes, salientando-se aqui genes relacionados à resposta imune. Até 2011 haviam sido identificados efeitos regulatórios da vitamina D em 900 genes (55). Atualmente estima-se que ela exerça essa atividade regulatória em aproximadamente 2.000 genes (54).



**Figura 1. Mecanismo de ação da vitamina D**

Abreviações: DNA (ácido desoxirribonucleico); MR (moléculas regulatórias de transcrição genética); RNAm (ácido ribonucleico mensageiro); RXR (receptor X retinóico); VDR (receptor de vitamina D); VDRE (elemento de resposta à vitamina D).  
Fonte: Modificado de Oliveira, N.M.O., *et al.* Papel da vitamina D na susceptibilidade para o diabetes *mellitus* tipo 1. 2010.

### 2.3.2 Vitamina D e Fígado

Nos últimos anos, a relação da vitamina D nas doenças hepáticas tem sido visivelmente expandida, já que o fígado é um órgão essencial na sua síntese, sendo o local da conversão enzimática da forma inativa de vitamina D

em sua forma ativa como já comentado. A deficiência de Vitamina D tem se demonstrado frequente em pacientes portadores de doenças hepáticas, uma vez que, foi notificada em 70% dos pacientes com hepatite crônica, independentemente da etiologia, 22% dos quais apresentavam deficiência grave de vitamina D (56)

Um estudo italiano incluindo cento e noventa e sete pacientes com genótipo 1 (G1) para HCV e quarenta e nove indivíduos saudáveis relatou baixos níveis séricos de vitamina D associados a maior progressão para fibrose grave e baixa RVS em pacientes em terapia com IFN e RBV(57). A hipovitaminose D também foi associada a alta atividade necroinflamatória em pacientes com HCV(58), descompensação da cirrose (59), maior incidência de HCC (60) e piores taxas de resposta à terapia antiviral (61,62).

Três diferentes ensaios in vitro (63–65) indicaram que a vitamina D exerce um efeito antiviral, reduzindo a carga viral do HCV. Yano et al. estudaram os efeitos da vitamina D na replicação do RNA do HCV em cultura de células, observando que a vitamina D2 inibe a replicação do RNA do HCV em concentrações maiores do que as encontradas na circulação (63). Ela também interagia com o IFN em cultura de células para inibir a replicação do RNA do HCV (66), reação esta, que os autores explicam como um efeito poupador de IFN (67), considerando que a vitamina D poderia ser um potencial coadjuvante para aumentar o efeito do tratamento com PEG-IFN.

Duas meta-análises relataram uma interessante associação entre pacientes com HCV (genótipos 1, 2, 3 e 4) com níveis de Vitamina D inferiores a 20 ng/mL e uma resposta negativa ao tratamento com PEG-IFN (61,68). Em apoio à hipótese, um ensaio clínico mostrou que a suplementação de vitamina

D3 aumentou as taxas de RVS em pacientes com HCV com genótipo *1L28B* rs8099917, sendo este um genótipo desfavorável para RVS, durante o tratamento com simeprevir, PEG-INF e RBV (69).

### **2.3.3 Estudos com o uso da Vitamina D no HCV**

Mesmo que ainda seja desconhecido o exato processo de atuação da vitamina D na resposta imune inata e adaptativa, já podem ser encontradas na literatura relações significativas entre a deficiência de vitamina D e maior suscetibilidade à infecção crônica por HCV, além de falhas da RVS em pacientes com níveis séricos reduzidos de vitamina D (62). Porém, é ainda controverso se a suplementação de vitamina D impacta ou não no resultado do tratamento para HCV.

Um estudo retrospectivo de pacientes italianos tratados com IFN-RBV para HCV pós-transplante hepático constatou que o grupo que recebeu tratamento concomitante com vitamina D teve taxas de RVS significativamente maiores (70). Dois estudos randomizados que também investigaram o efeito da suplementação de vitamina D3 diária com 2.000 UI em pacientes em uso de IFN-RBV mostraram que a suplementação de vitamina D aumenta a taxa de RVS em pacientes infectados com genótipos 1,2 e 3 de HCV (71,72). No primeiro estudo citado, de Abu-Mouch e colegas, com uma amostra de setenta e dois pacientes com genótipo 1 de HCV crônico, o grupo de tratamento recebeu PEG-IFN (1,5 µg / kg por semana) mais RBV (1000-1200 mg / dia) em conjunto a suplementação diária de vitamina D de 2.000 UI, enquanto o grupo controle recebeu o mesmo tratamento antiviral sem suplementação de vitamina

D. Neste estudo, o grupo tratado com vitamina D apresentou uma taxa mais elevada de RVS (71). Nimer e colaboradores obtiveram resultados semelhantes (72). Em contrapartida, um estudo realizado por Ladero e colegas envolvendo 41 pacientes com HCV diagnosticados com deficiência de vitamina D não encontrou qualquer efeito significativo do tratamento com vitamina D sob a carga viral ou nos marcadores bioquímicos de necroinflamação (73). Outro estudo envolvendo pacientes HCV genótipo 1 ou 4 que tinham previamente baixa RVS também não observou resposta positiva na RVS quando os níveis de vitamina D foram corrigidos antes de iniciar a terapia com IFN-RBV (74). Estas controvérsias estimulam a investigação de outros fatores que possam justificar a influência positiva da ação da vitamina D para determinados grupos e não para outros, tais como fatores genéticos que controlem a atuação da vitamina D no sistema imunológico.

Também é importante ressaltar que a progressão do HCV pode levar a uma redução dos níveis séricos de vitamina D ao afetar diretamente a produção do precursor da vitamina D no fígado, o que pode complicar os estudos que avaliam correlações desta vitamina e HCV (75). A redução da função hepática no decorrer da doença resulta em uma expressão reduzida das enzimas envolvidas na hidroxilação da vitamina D, o que pode explicar os baixos níveis de vitamina D observados na cronicidade da doença após infecção. A proteína de ligação da vitamina D (DPB) também é reduzida na doença hepática crônica, reduzindo a disponibilização de vitamina D aos tecidos, podendo complicar ainda mais os estudos em pacientes HCV (76).

Petta e colegas observaram que além da fibrose avançada, os pacientes com fibrose hepática leve também possuíam baixos níveis de vitamina D, o que

significa que não apenas um fígado em estágio avançado de perda de função pode ser considerado preditor de níveis séricos reduzidos de vitamina D, mas outras causas, incluindo fatores genéticos, podem influenciar os níveis de vitamina D(57). Estudos *in vitro* (63,67) mostram que a vitamina D diminui a replicação viral, porém mais estudos clínicos são necessários para determinar se os pacientes com HCV podem se beneficiar do tratamento com vitamina D complementar.

#### **2.3.4 Receptor de Vitamina D (VDR)**

Identificado pela primeira vez em 1974 (77), o receptor da vitamina D (VDR) é um fator de transcrição de 50 kDa, pertencente à superfamília de receptores nucleares, a qual também inclui os receptores esteroides (andrógenos, estrógenos, glicocorticoides, mineralocorticoides, hormônios da tireoide e do ácido retinóico). Este receptor é essencial para que a forma biologicamente ativa da vitamina D possa mediar suas atribuições, dentre as quais se destacam: influência em genes que atuam no equilíbrio celular, desenvolvimento, ação moduladora da resposta imune e presença em mais de 50 tipos de células (78,79). Especialmente relacionado ao sistema imunológico, VDR é um fator de transcrição de ligação ao DNA expresso principalmente em monócitos do sangue periférico e linfócitos T ativados (80,81).

A estrutura molecular do VDR consiste em cinco domínios (A-E) agrupados em quatro regiões funcionais distintas, das quais duas se destacam: a região que abriga o domínio de ligação ao DNA (DBD: 24-89 aa, região C), localizada próximo à porção amino-terminal do receptor e que é composta por

dois eixos de zinco responsáveis pelo reconhecimento de regiões específicas do DNA nos genes-alvo; e a região localizada na porção carboxi-terminal e que abriga o domínio de ligação ao ligante (LBD: 126-427 aa; região E), o qual é responsável pelo acoplamento da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ . A ligação da vitamina D ao VDR causa mudanças conformacionais dentro do receptor que permitem a heterodimerização do VDR com o receptor retinoide X (RXR) e posteriormente uma interação com moléculas co-reguladoras(82).

O heterodímero ligante acopla-se em locais específicos do DNA, conhecidos como elementos responsivos à vitamina D (VDREs) (83), facilitando a transcrição do gene. Os homodímeros de VDR também podem se ligar ao DNA para regular a expressão do gene na ausência de RXR. Excepcionalmente, o VDR também pode afetar a transcrição do gene quando não se encontra acoplado (82). Além de mediar as ações de  $1,25\text{D}$ , análogos sintéticos de VDR, como o ácido biliar, ácido litocólico (LCA), podem funcionar como ligantes secundários do receptor (84). O VDR é expresso em praticamente todos os tecidos do corpo, embora seus níveis de expressão variem significativamente entre as diferentes células (85).

Os hepatócitos possuem baixíssima expressão de VDR, porém, este, está altamente expresso nas células não parenquimatosas hepáticas, como células de Kupffer, células endoteliais e células estreladas hepáticas (86). Em indivíduos com HCC, a expressão proteica de VDR no fígado foi observada como sendo inversamente proporcional à gravidade de fibrose e inflamação (87,88). Modelos nocaute em ratos concluíram que fibrose hepática espontânea ocorre quando um ou ambos os alelos do *VDR* são suprimidos,

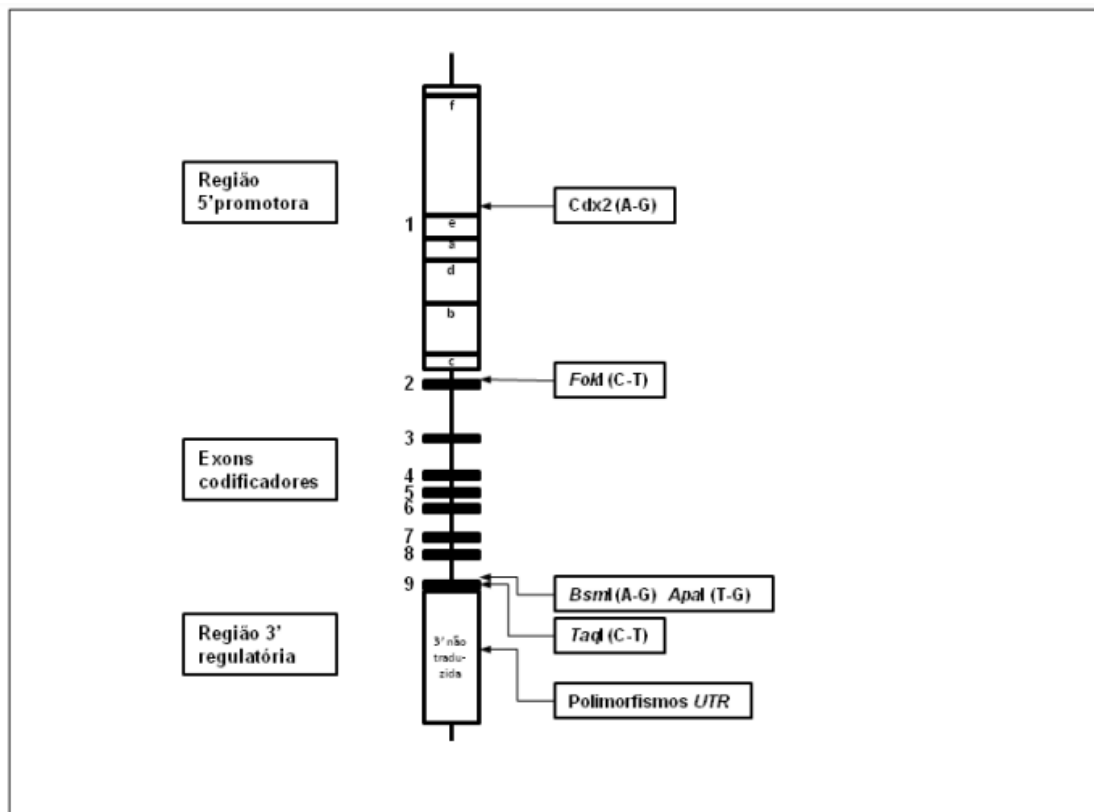


com estágio de fibrose mais grave observado em camundongos VDR negativos (-/-) (89).

### **2.3.5 Gene *VDR* e HCV**

O VDR é codificado a partir de um único gene localizado no cromossomo 12, posição 12q12.1, chamado de gene *VDR*, o qual pode ser regulado por fatores ambientais, genéticos e epigenéticos. Este gene consiste de nove exons distribuídos entre as regiões 5' promotora e 3' regulatória (90).

Os polimorfismos do gene *VDR* estão presentes principalmente nas regiões promotoras próximas ao éxon 1, entre os éxons 2 e 9 e na região 3'UTR, o que pode relacioná-los a alterações da expressão genética ou ainda à modificação da função da vitamina D, tornando-a ineficiente. Dentre os SNPs mais descritos na literatura estão o Cdx2 (G>A), FokI (C>T), BsmI (A>G), EcoRV (G>A), ApaI (G>T) e TaqI (T>C) (91,92).



**Figura 2.** Estrutura do gene VDR e localização dos principais polimorfismos conhecidos.

Fonte: Adaptado de Uitterlinden, A.G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004 (3).

Após a identificação da presença da molécula VDR em células responsáveis pela resposta imune, tais como células dendríticas, mononucleares, células apresentadoras de antígeno, linfócitos B e T, observou-se que esta poderia exercer atividade imunorregulatória (93). O VDR atua como um fator de transcrição estimulado por ligante e ativa 1,25 (OH)  $2D_3$  ao nível transcricional. Essa ativação contribui para a regulação da resposta imune ao inibir a proliferação de células T helper 1 (Th1) e a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de induzir a proliferação de células Th2 e a produção de

citocinas anti-inflamatórias (94–96). A presença de polimorfismos no gene *VDR* capazes de alterar a estrutura da proteína VDR levando a um receptor disfuncional, pode trazer também, uma disfuncionalidade na atuação da vitamina D nos processos imunológicos (95).

Estudos envolvendo polimorfismos do gene *VDR* são importantes para a avaliação do potencial impacto no tratamento de doenças hepáticas. Assim, o haplótipo VDR bAt (haplótipo dos alelos BsmI, ApaI e TaqI) foi associado à falha de resposta à terapia com IFN-RBV em pacientes HCV+ (97,98). Além disso, estes mesmos polimorfismos também foram associados à falha do tratamento e RVS insuficiente (99). Uma metanálise destacou quatro grandes estudos relacionando significativamente os parâmetros plasmáticos de 25(OH)D e sua associação com polimorfismos do gene *VDR*(51).

No fígado, polimorfismos do *VDR* podem influenciar a regulação imunológica afetando os níveis de citocinas, que são mediadores essenciais na fisiopatologia da doença hepática, pois desempenham importantes papéis na regeneração hepática e na fibrose (100). As células hepáticas não parenquimatosas, que estão envolvidas no desenvolvimento da fibrose hepática, podem produzir rapidamente citocinas pró-fibrogênicas que levam à inflamação hepática e à fibrose (101). Desta forma, fica claro que polimorfismos do *VDR* podem desempenhar um papel na progressão da doença hepática (102,103).

Variações genéticas no gene *VDR* também foram associadas a outras doenças com grande envolvimento do sistema imunológico, como tuberculose (104), lúpus eritematoso sistêmico (105), hepatite autoimune, cirrose biliar

primária (6,102,106), câncer de fígado (107) e infecção pelo vírus da hepatite B (108,109). Além disso, algumas variantes foram associadas à rápida progressão da fibrose e baixa resposta ao tratamento em casos crônicos de infecção por HCV(62,97,98,110). No entanto, há poucas evidências disponíveis quanto a associação de polimorfismos *VDR* e a suscetibilidade à infecção pelo HCV e sua progressão.

Um estudo de Baur e colaboradores encontrou relação entre a progressão da fibrose hepática e a presença de polimorfismos *VDR* (*Apal*, *TaqI* e *BsmI*) indicando que *BsmI* e *TaqI* estavam associados com cirrose progressiva em pacientes com PBC e em pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica (NAFLD), o *VDRA*, expressão do mRNA, e os genes pró-fibrogênicos foram significativamente afetados pelo polimorfismo *BsmI* (110). Infelizmente, o estudo não avaliou a variante *FokI*.

### **2.3.6 VDR na fibrose hepática**

Tendo em vista que a molécula *VDR* é expressa em uma ampla variedade de células e sua expressão está significativamente aumentada em células estreladas hepáticas (HSCs), quando estas estão ativas, surge a hipótese que o fígado pode responder à vitamina D durante o processo de fibrose por meio de suas células não parenquimatosas, tais como as HSCs, conhecidas por ter uma importante atuação na fibrogênese. Além disso, *VDR* também pode estar envolvida na patogênese do HCC, uma vez que suas atribuições para o desenvolvimento de HCC pode-se dar por meio da ativação deste grupo de células. Abramovitch e colegas mostraram, em 2011, que a

ligação de VDR em HSCs tinha potencial de inibir a proliferação e ativação deste importante grupo de células, além de reduzir a fibrose hepática induzida em modelos animais de fibrose (111). Além disso, um estudo de Ding e colegas revelou que a ligação VDR em HSCs ativadas possui efeitos antifibróticos, que são mediados pela sinalização de TGF- $\beta$ /SMAD (89).

A via de sinalização VDR-SMAD-HSC faz com que a ligação do VDR reduza a ativação de HSC em cultura de HSCs humanos, potencialmente indicando uma redução na possibilidade de desenvolvimento de fibrose e também de HCC (112). O VDR após a ligação com a vitamina D em sua forma ativa, compete pelos mesmos locais que o SMAD3, um efetor da cascata do TGF $\beta$ 1 e importante quimiocina fibrogênica, inibindo a transcrição de genes pró-fibrogênese que são ativados pelo TGF $\beta$ /SMAD (113).

Recentemente, Wahsh e colegas, usando um modelo animal de fibrose, descobriram que a vitamina D, quando ligada ao VDR, modula as vias fibrogênicas atenuando a fibrose hepática quando administrada em uma dose de 80 ug / kg (114). Os autores observaram, a partir de análises histológicas, que a vitamina D devidamente ativa melhorou a função hepática, reduziu a inflamação do fígado, necrose e fibrose. Este mesmo estudo demonstrou que a vitamina D reduz o colágeno-1-alfa-1 hepático (Col1a1), o inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) e a proteína TGF- $\beta$ 1, bem como a atividade da via TGF $\beta$ /SMAD, sendo este, o mecanismo mais fibrogênico relacionado ao fígado (114). Para complementar, Belifuss et al., também observaram que a vitamina D ativa desempenha o papel de reprimir a sinalização de TGF- $\beta$  fibrogênica em HSCs (115).

### **2.3.7 VDR no hepatocarcinoma**

Como comentado anteriormente, o carcinoma hepatocelular (HCC) ainda é uma das principais causas de morte relacionada ao câncer em todo o mundo, por isso, diversos estudos têm se voltado a possíveis intervenções precoces a esta doença (116). O papel do VDR no HCC tem recebido atenção considerável. Polimorfismos no gene *VDR*, bem como níveis baixos de vitamina D sérica, foram associados ao desenvolvimento de HCC em pacientes com cirrose alcoólica (117). Da mesma forma, o tratamento com vitamina D foi associado à atividade antiproliferativa em várias culturas de células de carcinoma hepatocelular (118,119). Alguns estudos envolvendo análogos da vitamina D (EB1089, CB 1093 e MART-10), revelaram o potencial destes como agentes terapêuticos para HCC (120). Esse potencial pode ser salientado pelo estudo de EB1089, um ligante VDR sintético que diminuiu o desenvolvimento de HCC em camundongos C3H / Sy, uma linhagem predisposta à carcinogênese hepática espontânea (121).

### **2.3.8 Polimorfismo FokI *VDR* e HCV**

Entre os diversos polimorfismos do gene *VDR* descritos na literatura, o polimorfismo FokI (rs2228570) é um dos únicos com potencial de afetar a estrutura primária da proteína VDR. Mesmo que os resultados de estudos sejam controversos, polimorfismos do gene *VDR* com baixa capacidade de alterar níveis plasmáticos de vitamina D podem, porém, possivelmente interferir na cascata de atuação da vitamina D, fazendo com que a mesma não desempenhe seu papel efetivo na saúde humana (3).

O polimorfismo FokI está localizado na região codificadora do gene *VDR* e leva a uma transição T/C (ATG para ACG), treonina por cisteína, resultando em uma proteína VDR com uma estrutura modificada, criando um novo códon de iniciação e consequentemente uma proteína VDR encurtada por três aminoácidos, o que torna a proteína mais ativa e funcional do que a do tipo selvagem (122,123). É importante salientar que esta proteína tem maior atividade transcricional em comparação com a proteína VDR de comprimento longo (122–124). O comprimento da proteína VDR influencia a regulação da transcrição gênica por meio da ocupação de sítios de reconhecimento de outros fatores de transcrição, além de interferir em suas vias de sinalização (96). Portanto, a presença da variante que dá origem a uma proteína VDR mais longa está associada a uma redução da atividade transcricional e, potencialmente, a um aumento do risco de suscetibilidade a doenças (123).

Experimentos de transfecção (processo de introdução intencional de ácido nucleicos nas células), com o genótipo C/C do polimorfismo FokI demonstraram a expressão de uma proteína VDR mais curta em 3 aminoácidos, a qual levava a maior transcrição dirigida por NF-kappa B e fator nuclear das células T ativadas (NFAT). Diferenças importantes foram observadas na transcrição conduzida pela proteína ativadora 1 (AP-1), que está relacionada com a regulação de processos celulares, tais como proliferação, crescimento, diferenciação, apoptose e migração celular. Em monócitos humanos e células dendríticas com um genótipo C/C do VDR (proteína mais curta), a expressão de IL-12, que atua em atividades citotóxicas em resposta à vírus e patógenos, foi maior do que em células com um genótipo VDR T/T (proteína mais longa). Além disso, os linfócitos com um genótipo C/C VDR

proliferaram mais fortemente em resposta à fitohemaglutinina (agente mitótico utilizado em estudos que envolvem a permeabilidade de células) (96). Estas evidências sugerem que o polimorfismo FokI VDR afeta o comprimento da proteína sintetizada e, conseqüentemente, o comportamento das células imunológicas, associando-se o genótipo VDR C/C (proteína mais curta) a um sistema imunológico mais ativo e eficiente. Assim, surge uma base para avaliar este polimorfismo em doenças imunomediadas, tais como o HCV.

Um recente estudo com pacientes cirróticos devido a diferentes patologias hepáticas (HCV, HVB, doença hepática gordurosa não alcoólica e hepatite autoimune), mostrou que a presença do polimorfismo FokI (genótipo C/C) estava associada a níveis significativamente mais baixos de IL-1 $\beta$ , sendo esta, uma importante interleucina mediadora da resposta imune contra infecções, inflamações e lesões teciduais. Pacientes com o genótipo C/C produzem uma forma mais curta de VDR, levando a maior atividade transcricional, formação de complexos mais ativos de VDR-vitamina D, inibição da resposta Th1 e indução da resposta de células Th2. Portanto, os pacientes com o genótipo FokI C/C podem ter uma melhor resposta à vitamina D, resultando em uma menor taxa de progressão e um possível papel protetor na cirrose hepática. No entanto, os autores sugeriram que esta hipótese deve ser explorada em outros pacientes para ser confirmada (125).

O polimorfismo FokI também foi associado na resposta à terapia com PEG-IFN e várias doenças hepáticas crônicas, incluindo hepatite autoimune e HCC em pacientes com infecção HVB crônica, sendo que portadores de genótipo T/T apresentaram um risco significativamente maior no desenvolvimento de HCC segundo alguns autores (4–6).



Um estudo de Thanapirom e colegas em 2019 com pacientes tailandeses tratados com PEG-INF para HCV, encontrou uma associação entre o polimorfismo FokI e fibrose hepática avançada em pacientes com infecção crônica por HCV, o que os levou a afirmar que o alelo T FokI (rs2228570), tanto em homozigose quanto em heterozigose seria um fator de risco para fibrose hepática avançada (126).

### **3. JUSTIFICATIVA**

Sabemos que há grande diversidade em relação aos pacientes HCV e a progressão da doença. Existem evidências que diferentes respostas na fase inicial dependem de fatores imunológicos inatos e adaptativos, e que fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar as respostas imunológicas modificando a susceptibilidade à infecção e sua progressão. Desta forma, a análise dos fatores imunológicos e genéticos que influenciam a susceptibilidade à infecção HCV permitirá uma melhor compreensão dos fatores que participam na relação vírus-hospedeiro antes do estabelecimento da infecção.

Além disso, a investigação do papel genético dos fatores que conectam o sistema imune inato e adaptativo, caso do receptor de vitamina D, em diferentes estágios clínicos da doença, pode trazer mais informações sobre a regulação do sistema imune. De fato, diferentes moléculas do sistema imune foram implicadas em um primeiro momento da infecção, modulando positivamente a infecção (inibindo a entrada do vírus) ou negativamente, favorecendo a disseminação do vírus através do recrutamento de células alvo e sua migração celular a novos focos de infecção. Ainda cabe salientar a importância da identificação e o estabelecimento de biomarcadores para o monitoramento clínico de indivíduos HCV que geralmente chegam ao hospital na fase crônica da infecção.

Finalmente, torna-se de grande importância o estudo da influência de variações genéticas para contribuir para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, com menor risco de eventos adversos, possibilitando uma terapia mais individualizada e segura.

#### **4. QUESTÃO DA PESQUISA**

O polimorfismo FokI do gene *VDR* confere proteção ou suscetibilidade à infecção pelo HCV? Há influência desta variante genética na progressão dos desfechos hepáticos relacionados à hepatite C?

## **5. HIPÓTESE**

A presença do alelo variante de FokI *VDR* em heterozigose ou homozigose confere proteção contra a infecção pelo vírus HCV e é favorável a um melhor desfecho no desenvolvimento de doenças hepáticas decorrentes desta infecção.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência do polimorfismo FokI do gene *VDR* no risco à infecção pelo HCV e na progressão da doença.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a suscetibilidade à infecção pelo HCV nos indivíduos com polimorfismo do gene *VDR*;
- Analisar a relação entre a progressão das doenças hepáticas (fibrose, cirrose e hepatocarcinoma) no grupo HCV e o polimorfismo FokI.

## 8. CONCLUSÕES

Considerando as comparações de genótipos entre os grupos, o grupo de indivíduos HCV+ (sem considerar estratificação por perfil clínico;  $n=222$ ) e o subgrupo de indivíduos HCV+ com fibrose ( $n=35$ ) diferiram estatisticamente do grupo Controle, com valores de  $p=0.031$  e  $p=0.032$ , respectivamente.

Para saber quais genótipos foram responsáveis por estas diferenças entre os grupos, olhou-se para as análises de resíduos, as quais indicaram que as diferenças estavam especificamente nos genótipos CC e CT. Para ambos os grupos que diferiram do grupo Controle, o genótipo CC foi associado com proteção contra infecção pelo HCV e menor risco de desenvolvimento de fibrose, pois o genótipo mostrou-se significativamente em maior proporção no grupo Controle (57,59%) do que nos grupos de indivíduos infectados pelo HCV (HCV+: 45,95% e HCV+/fibrose: 37,14%). Em relação ao genótipo CT, o mesmo foi associado com maior risco de infecção pelo HCV e maior risco de desenvolvimento de fibrose, pois o genótipo mostrou-se significativamente em maior proporção grupos de indivíduos infectados pelo HCV (HCV+: 43,24% e HCV+/fibrose: 54,29%) do que no grupo Controle (30,89%). Não foram observadas diferenças estatísticas nas demais comparações entre grupos envolvendo genótipos.

Os resultados sugerem um efeito protetivo do alelo C em relação à infecção pelo HCV e desenvolvimento fibrose (sob a forma homozigota; genótipo CC). O resultado referente ao genótipo heterozigoto é questionável, pois, as comparações entre alelos não indicaram diferenças estatísticas entre os grupos, provavelmente devido ao número amostral limitado.

## **9. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste trabalho, apresentamos a atuação do polimorfismo genético FokI do gene *VDR* em pacientes infectados pelo HCV, onde observamos uma interessante relação do alelo C, sob a forma de homozigose, quanto a proteção a infecção pelo HCV e ao desenvolvimento de fibrose. Estudos adicionais com grupos populacionais diferentes são importantes para corroborar estes resultados.

## 10. REFERÊNCIAS

1. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. Vol. 44, Gastroenterology Clinics of North America. W.B. Saunders; 2015. p. 717–34.
2. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic Variation in IL28B Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-Wide Association Study. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1338-1345.e7.
3. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JBJ, Pols HAP, Van Leeuwen JPTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. Vol. 338, *Gene*. Elsevier; 2004. p. 143–56.
4. Yao X, Zeng H, Zhang G, Zhou W, Yan Q, Dai L, et al. The association between the VDR gene polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma and the clinicopathological features in subjects infected with HBV. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
5. Mostafa-Hedeab G, Sabry D, Abdelaziz GM, Ewaiss M, Adli N, Fathy W. Influence of Vitamin D receptor gene polymorphisms on response to pegylated interferon in chronic hepatitis B Egyptian patients. *Reports Biochem Mol Biol*. 2018;6(2):186–96.
6. Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2002;35(1):126–31.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Prevenção e Controle das IST do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico Hepatites Virais 2020. 2020;80.
8. Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, Bruzzone B, Icardi G. Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol*.



2014;20(29):9633–52.

9. World Health Organization. WHO | Hepatitis C. Who. 2017.
10. Lombardi A, Mondelli MU. Hepatitis C: Is eradication possible? *Liver Int.* 2019;39(3):416–26.
11. Alter MJ. HCV routes of transmission: What goes around comes around. *Semin Liver Dis.* 2011;31(4):340–6.
12. Bostan N, Mahmood T. An overview about hepatitis C: A devastating virus. Vol. 36, *Critical Reviews in Microbiology*. 2010. 91–133 p.
13. Averhoff FM, Glass N, Holtzman D. Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare providers in the United States. *Clin Infect Dis.* 2012;55 Suppl 1(Suppl 1):10–5.
14. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* 2013;57(4):1333–42.
15. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: A chronic problem. Vol. 47, *Hepatology*. NIH Public Access; 2008. p. 321–31.
16. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J.* 2011;8(1):161.
17. Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci.* 2014;8(1):19–25.
18. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* 2004;12(2):96–102.
19. Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: Why does it really matter? *Gut.* 2006;55(1):123–30.
20. Catamo E, Zupin L, Freato N, Polesello V, Celsi F, Crocè SL, et al. HLA-G regulatory polymorphisms are associated with susceptibility to HCV

- infection. *Hla*. 2017;89(3):135–42.
21. Guo PF, Jin J, Sun X. Influence of IL10 gene polymorphisms on the severity of liver fibrosis and susceptibility to liver cirrhosis in HBV/HCV-infected patients. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015;30(December):89–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.011>
  22. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655–69.
  23. Nishikawa H, Osaki Y. Liver Cirrhosis: Evaluation, Nutritional Status, and Prognosis. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
  24. De Bruijne J, Weegink CJ, Jansen PLM, Reesink HW. New developments in the antiviral treatment of hepatitis C. *Vox Sang*. 2009;97(1):1–12.
  25. Heikenwälder M, Pikarsky E. Learning the Roles of the Hepatic Adaptive Immune System in Hepatocellular Carcinoma--Nature's Guide for Successful Cancer Immunotherapy. *Semin Liver Dis*. 2017;37(3):210–8.
  26. Saludes V, González V, Planas R, Matas L, Ausina V, Martró E. Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. *World J Gastroenterol*. 2014;20(13):3431–42.
  27. Behairy BES, Sira MM, Zalata KR, Salama ESE, Abd-Allah MA. Transient elastography compared to liver biopsy and morphometry for predicting fibrosis in pediatric chronic liver disease: Does etiology matter? *World J Gastroenterol*. 2016;22(16):4238–49.
  28. Jung KS, Kim SU. Clinical applications of transient elastography. *Clin Mol Hepatol*. 2012;18(2):163–73.
  29. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): A prospective study. *Gut*. 2006;55(3):403–8.
  30. Meng F, Zheng Y, Zhang Q, Mu X, Xu X, Zhang H, et al. Noninvasive evaluation of liver fibrosis using real-time tissue elastography and transient elastography (FibroScan). *J Ultrasound Med*. 2015;34(3):403–10.

31. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC WR. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J surgery*. 1973;60(8):1971–4.
32. Merion RM. When is a patient too well and when is a patient too sick for a liver transplant. *Liver Transplant*. 2004;10(10 SUPPL. 2):69–73.
33. Santantonio T, Fasano M, Sinisi E, Guastadisegni A, Casalino C, Mazzola M, et al. Efficacy of a 24-week course of PEG-interferon  $\alpha$ -2b monotherapy in patients with acute hepatitis C after failure of spontaneous clearance. *J Hepatol*. 2005;42(3):329–33.
34. Dore GJ, Ward J, Thursz M. Hepatitis C disease burden and strategies to manage the burden (Guest Editors Mark Thursz, Gregory Dore and John Ward). *J Viral Hepat*. 2014;21:1–4.
35. Ortega-Prieto AM, Dorner M. Immune evasion strategies during chronic hepatitis B and C virus infection. *Vaccines*. 2017;5(3).
36. Asselah T, Bieche I, Narguet S, Sabbagh A, Laurendeau I, Ripault MP, et al. Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gut*. 2008;57(4):516–23.
37. Albert PR. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. Vol. 36, *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. Canadian Medical Association; 2011. p. 363–5.
38. Enrique A. Mesri, Mark Feitelson KM. Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis. *Bone*. 2012;23(1):1–7.
39. Phillips CM. Nutrigenetics and metabolic disease: Current status and implications for personalised nutrition. *Nutrients*. 2013;5(1):32–57.
40. Lan N, Lu Y, Zhang Y, Pu S, Xi H, Nie X, et al. FTO – A Common Genetic Basis for Obesity and Cancer. Vol. 11, *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 559138.
41. Fenech M, El-Sohehy A, Cahill L, Ferguson LR, French TAC, Tai ES, et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: Viewpoints on the current status and

- applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4(2):69–89.
42. Wintermeyer E, Ihle C, Ehnert S, Stöckle U, Ochs G, de Zwart P, et al. Crucial role of vitamin D in the musculoskeletal system. Vol. 8, *Nutrients*. MDPI AG; 2016.
  43. DeLuca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep*. 2014 Jan 8;3:479.
  44. Peixoto P V., Klem MAP, França TN, Nogueira VA. Hipervitaminose D em animais. *Pesqui Vet Bras*. 2012;32(7):573–94.
  45. Huotari A, Herzig KH. Vitamin D and living in northern latitudes - An endemic risk area for vitamin D deficiency. Vol. 67, *International Journal of Circumpolar Health*. Int J Circumpolar Health; 2008. p. 164–78.
  46. Holick MF. Medical progress: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266–81.
  47. Cohen ML, Douvdevani A, Chaimovitz C, Shany S. Regulation of TNF- $\alpha$  by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in human macrophages from CAPD patients. *Kidney Int*. 2001;59(1):69–75.
  48. Gutierrez JA, Parikh N, Branch AD. Classical and emerging roles of vitamin D in hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis*. 2011;31(4):387–98.
  49. Premaor MO, Furlanetto TW. Vitamin D deficiency in adults: To better understand a new presentation of an old disease. Vol. 50, *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2006. p. 25–37.
  50. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. Vol. 289, *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. Am J Physiol Renal Physiol; 2005.
  51. McGrath JJ, Saha S, Burne THJ, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. Vol. 121, *Journal of Steroid*

- Biochemistry and Molecular Biology. J Steroid Biochem Mol Biol; 2010. p. 471–7.
52. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: Modulation of innate and autoimmunity. Vol. 88, Journal of Molecular Medicine. Springer; 2010. p. 441–50.
  53. Bueloni-Dias FN, Orsatti CL, Cangussu LM, Poloni PF, Spadoto-Dias D, Nahas-Neto J, et al. Isolated vitamin D supplementation improves the immune-inflammatory biomarkers in younger postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Menopause. 2018;25(8):897–903.
  54. Stokes CS, Volmer DA, Grünhage F, Lammert F. Vitamin D in chronic liver disease. Vol. 33, Liver International. Liver Int; 2013. p. 338–52.
  55. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, et al. Large-scale in Silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. Mol Endocrinol. 2005 Nov;19(11):2685–95.
  56. Arteh J, Narra S, Nair S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. Dig Dis Sci. 2010 Sep 4;55(9):2624–8.
  57. Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Marco V Di, Bono A, et al. Low vitamin d serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. Hepatology. 2010 Apr 1;51(4):1158–67.
  58. Dadabhai AS, Saberi B, Lobner K, Shinohara RT, Mullin GE. Influence of vitamin D on liver fibrosis in chronic hepatitis C: A systematic review and meta-analysis of the pooled clinical trials data. World J Hepatol. 2017;9(5):278–87.
  59. Finkelmeier F, Kronenberger B, Zeuzem S, Piiper A, Waidmann O. Low 25-hydroxyvitamin D levels are associated with infections and mortality in patients with cirrhosis. PLoS One. 2015 Jun 29;10(6).
  60. Fedirko V, Duarte-Salles T, Bamia C, Trichopoulou A, Aleksandrova K,

- Trichopoulos D, et al. Prediagnostic circulating vitamin D levels and risk of hepatocellular carcinoma in European populations: A nested case-control study. *Hepatology*. 2014 Oct 1;60(4):1222–30.
61. García-Álvarez M, Pineda-Tenor D, Jiménez-Sousa MA, Fernández-Rodríguez A, Guzmán-Fulgencio M, Resino S. Relationship of vitamin D status with advanced liver fibrosis and response to hepatitis C virus therapy: A meta-analysis. *Hepatology*. 2014 Nov 1;60(5):1541–50.
  62. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, Von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol*. 2011;54(5):887–93.
  63. Yano M, Ikeda M, Abe KI, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, et al. Comprehensive analysis of the effects of ordinary nutrients on hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):2016–27.
  64. Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, et al. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology*. 2009 Sep 1;50(3):678–88.
  65. Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, et al. Vitamin D: An innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology*. 2011 Nov;54(5):1570–9.
  66. Gutierrez JA. Vitamin D Metabolites Inhibit Hepatitis C Virus and Modulate Cellular Gene Expression. *J Virol Antivir Res*. 2014;03(03).
  67. Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, et al. Vitamin D: An innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology*. 2011 Nov;54(5):1570–9.
  68. Villar LM. Association between vitamin D and hepatitis C virus infection: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2013 Sep 21;19(35):5917.
  69. Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Yoshizawa K, Abe H, Asano T, et al.

- Effect of native vitamin D3 supplementation on refractory chronic hepatitis C patients in simeprevir with pegylated interferon/ribavirin. *Hepatol Res.* 2016 Mar 1;46(5):450–8.
70. Bitetto D, Fabris C, Fornasiere E, Pipan C, Fumolo E, Cussigh A, et al. Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. *Transpl Int.* 2011 Jan;24(1):43–50.
  71. Abu-Mouch S, Fireman Z, Jarchovsky J, Zeina AR, Assy N. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naïve patients. *World J Gastroenterol.* 2011 Dec 21;17(47):5184–90.
  72. Nimer A, Mouch A. Vitamin D improves viral response in hepatitis C genotype 2-3 naïve patients. *World J Gastroenterol.* 2012 Feb 28;18(8):800–5.
  73. Ladero JM, Torrejón MJ, Sánchez-Pobre P, Suárez A, Cuenca F, de la Orden V, et al. Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol.* 2013 Mar 1;12(2):199–204.
  74. Terrier B, Lapidus N, Pol S, Serfaty L, Ratziu V, Asselah T, et al. Vitamin D in addition to peg-interferon-alpha/ribavirin in chronic hepatitis C virus infection: ANRS-HC25-VITAVIC study. Vol. 21, *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press; 2015. p. 5647–53.
  75. Clark PJ, Thompson AJ, Vock DM, Kratz LE, Tolun AA, Muir AJ, et al. Hepatitis C virus selectively perturbs the distal cholesterol synthesis pathway in a genotype-specific manner. *Hepatology.* 2012 Jul;56(1):49–56.
  76. Farnik H, Bojunga J, Berger A, Allwinn R, Waidmann O, Kronenberger B, et al. Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients. *Hepatology.* 2013 Oct;58(4):1270–6.
  77. Journal THE, Biological OF. in *Intestine.* 1974;249(4):1251–7.
  78. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? Vol. 523,

Archives of Biochemistry and Biophysics. Arch Biochem Biophys; 2012. p. 123–33.

79. Ruan L, Zhu JG, Pan C, Hua X, Yuan DB, Li ZM, et al. Association between single nucleotide polymorphism of vitamin D receptor Gene FokI polymorphism and clinical progress of benign prostatic hyperplasia. Sci World J. 2015 Jan 20;2015:235895–235895.
80. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin d<sub>3</sub> in human peripheral blood mononuclear cells: Presence in monocytes and induction in t lymphocytes following activation. J Clin Endocrinol Metab. 1983;57(6):1308–10.
81. Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. Vol. 78, Steroids. NIH Public Access; 2013. p. 127–36.
82. Ellison TI, Eckert RL, MacDonald PN. Evidence for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-independent transactivation by the vitamin D receptor: Uncoupling the receptor and ligand in keratinocytes. J Biol Chem. 2007 Apr 13;282(15):10953–62.
83. Sutton ALM, MacDonald PN. Vitamin D: More than a “bone-a-fide” hormone. Vol. 17, Molecular Endocrinology. 2003. p. 777–91.
84. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. Science (80- ). 2002 May 17;296(5571):1313–6.
85. Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A. Vitamin D and cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2006 Dec;102(1-5 SPEC. ISS.):156–62.
86. Gascon-Barré M, Demers C, Mirshahi A, Néron S, Zalzal S, Nanci A. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. Hepatology. 2003 May 1;37(5):1034–42.
87. Petta S, Grimaudo S, Tripodo C, Cabibi D, Calvaruso M, Di Cristina A, et al. The hepatic expression of vitamin D receptor is inversely associated



- with the severity of liver damage in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jan 1;100(1):193–200.
88. Barchetta I, Carotti S, Labbadia G, Gentilucci UV, Muda AO, Angelico F, et al. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: Relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatology.* 2012 Dec;56(6):2180–7.
  89. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell.* 2013;153(3):601–13.
  90. Miyamoto KI, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol.* 1997;11(8):1165–79.
  91. De Azevêdo Silva J, Fernandes KM, Pancotto JAT, Fragoso TS, Donadi EA, Crovella S, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus clinical manifestations. *Lupus.* 2013 Oct;22(11):1110–7.
  92. De Azevêdo Silva J, Guimarães RL, Brandão LAC, Araujo J, Segat L, Crovella S, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and age onset in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity.* 2013 Sep;46(6):382–7.
  93. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: New aetiological and therapeutic considerations. Vol. 66, *Annals of the Rheumatic Diseases.* Ann Rheum Dis; 2007. p. 1137–42.
  94. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: Preferential inhibition of Th1 functions. In: *Journal of Nutrition.* J Nutr; 1995.
  95. Cao Y, Wang X, Cao Z, Cheng X. Association of vitamin D receptor gene taq1 polymorphisms with tuberculosis susceptibility: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):10187–203.

96. van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: Functional impact on the immune system. *Eur J Immunol*. 2007;37(2):395–405.
97. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Frei P, et al. The vitamin D receptor gene bAt (CCA) haplotype impairs the response to pegylated-interferon/ribavirin-based therapy in chronic hepatitis C patients. *Antivir Ther*. 2012;17(3):541–7.
98. García-Martín E, Agúndez JAG, Maestro ML, Suárez A, Vidaurreta M, Martínez C, et al. Influence of Vitamin D-Related Gene Polymorphisms (CYP27B and VDR) on the Response to Interferon/Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. *PLoS One*. 2013;8(9).
99. Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Cmet S, et al. Vitamin D binding protein gene polymorphisms and baseline vitamin D levels as predictors of antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2012 Nov;56(5):1641–50.
100. Tilg H. Cytokines and liver diseases. Vol. 15, *Canadian Journal of Gastroenterology*. Pulsus Group Inc.; 2001. p. 661–8.
101. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21;20(23):7312–24.
102. Tanaka A, Nezu S, Uegaki S, Kikuchi K, Shibuya A, Miyakawa H, et al. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with increased susceptibility to primary biliary cirrhosis in Japanese and Italian populations. *J Hepatol*. 2009;50(6):1202–9.
103. Halmos B, Szalay F, Cserniczky T, Nemesanszky E, Lakatos P, Barlage S, et al. Association of primary biliary cirrhosis with vitamin D receptor BsmI genotype polymorphism in a Hungarian population. *Dig Dis Sci*. 2000;45(6):1091–5.
104. SALIMI S, FARAJIAN-MASHHADI F, ALAVI-NAINI R, TALEBIAN G, NAROOIE-NEJAD M. Association between vitamin D receptor polymorphisms and haplotypes with pulmonary tuberculosis. *Biomed*

Reports. 2015 Mar 1;3(2):189–94.

105. Carvalho C, Marinho A, Leal B, Bettencourt A, Boleixa D, Almeida I, et al. Association between vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Portuguese patients. *Lupus*. 2015 Jul 15;24(8):846–53.
106. Fan LY, Tu XQ, Zhu Y, Pfeiffer T, Feltens R, Stoecker W, et al. Genetic association of cytokines polymorphisms with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis in the Chinese. *World J Gastroenterol*. 2005 May 14;11(18):2768–72.
107. Yao X, Zeng H, Zhang G, Zhou W, Yan Q, Dai L, et al. The associated ion between the VDR gene polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma and the clinicopathological features in subjects infected with HBV. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
108. Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol*. 2006;44(5):856–63.
109. Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Cmet S, Fornasiere E, Cussigh A, et al. Association between vitamin D receptor genetic polymorphisms and acute cellular rejection in liver-transplanted patients. *Transpl Int*. 2012 Mar;25(3):314–22.
110. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Eloranta JJ, et al. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic Vitamin D Receptor (NR 111) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver Int*. 2012 Apr;32(4):635–43.
111. Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Tov A Ben, Brazowski E, et al. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut*. 2011;60(12):1728–37.
112. Angeles Duran, Eloy D. Hernandez, Miguel Reina-Campos EAC, Shankar Subramaniam, Sindhu Raghunandan, Lewis R. Roberts TK, Michael

- Karin MTD-M and JM. p62/SQSTM1 by binding to vitamin D receptor inhibits hepatic stellate cell activity, fibrosis and liver cancer. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
113. Finkelmeier F, Kronenberger B, Köberle V, Bojunga J, Zeuzem S, Trojan J, et al. Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency identifies a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma - A prospective cohort study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(10):1204–12.
  114. Wahsh E, Abu-Elsaad N, El-Karef A, Ibrahim T. The vitamin D receptor agonist, calcipotriol, modulates fibrogenic pathways mitigating liver fibrosis in-vivo: An experimental study. *Eur J Pharmacol.* 2016;789:362–9.
  115. Beilfuss A, Sowa JP, Sydor S, Beste M, Bechmann LP, Schlattjan M, et al. Vitamin D counteracts fibrogenic TGF- $\beta$  signalling in human hepatic stellate cells both receptor-dependently and independently. *Gut.* 2015 May 1;64(5):791–9.
  116. El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 2011 Sep 22;365(12):1118–27.
  117. Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fontanini E, Fornasiere E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2010;16(24):3016–24.
  118. Li Q, Gao Y, Jia Z, Mishra L, Guo K, Li Z, et al. Dysregulated Krppel-like factor 4 and vitamin D receptor signaling contribute to progression of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012;143(3):799.
  119. Duran A, Hernandez ED, Reina-Campos M, Castilla EA, Subramaniam S, Raghunandan S, et al. p62/SQSTM1 by Binding to Vitamin D Receptor Inhibits Hepatic Stellate Cell Activity, Fibrosis, and Liver Cancer. *Cancer Cell.* 2016;30(4):595–609.
  120. Pourgholami MH, Akhter J, Lu Y, Morris DL. In vitro and in vivo inhibition of liver cancer cells by 1,25- dihydroxyvitamin D3. *Cancer Lett.* 2000 Apr 3;151(1):97–102.

121. Sahpazidou D, Stravoravdi P, Toliou T, Geromichalos G, Zafiriou G, Natsis K, et al. Significant Experimental Decrease of the Hepatocellular Carcinoma Incidence in C3H/Sy Mice after Long-Term Administration of EB1089, a Vitamin D Analogue. *Oncol Res.* 2002;13(5):261–8.
122. Alimirah F, Peng X, Murillo G, Mehta RG. Functional significance of vitamin D receptor FokI polymorphism in human breast cancer cells. *PLoS One.* 2011;6(1).
123. Kerr Whitfield G, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HTL, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 May 25;177(1–2):145–59.
124. Elhoseiny SM, Morgan DS, Rabie AM, Bishay ST. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms (FokI, BsmI) and their Relation to Vitamin D Status in Pediatrics  $\beta$  Thalassemia Major. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2016 Jun 1;32(2):228–38.
125. Triantos C, Aggeletopoulou I, Kalafateli M, Spantidea PI, Vourli G, Diamantopoulou G, et al. Prognostic significance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in liver cirrhosis. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8(1).
126. Thanapirom K, Suksawatamnuay S, Sukeepaisarnjaroen W, Tangkijvanich P, Thaimai P, Wasitthankasem R, et al. Genetic associations of Vitamin D receptor polymorphisms with advanced liver fibrosis and response to pegylated interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *PeerJ.* 2019;2019(9).